



# ЧЛАНЦИ

ТАТЈАНА ВЕРБИЋ, Хемијски факултет, Универзитет у Београду (tatjanad@chem.bg.ac.yu)

## КАПИЛАРНА ЕЛЕКТРОФОРЕЗА: ОСНОВНИ ПРИНЦИПИ И ПРИМЕНА

### УВОД

Капиларна електрофореза је једна од данас најчешће коришћених техника за раздвајање супстанци. Ефикасност, брзина и једноставност у подешавању селективности, основне су предности које је врло често чине одабраном техником одвајања и одређивања чак и у конкуренцији са високо ефикасном течном хроматографијом (HPLC).

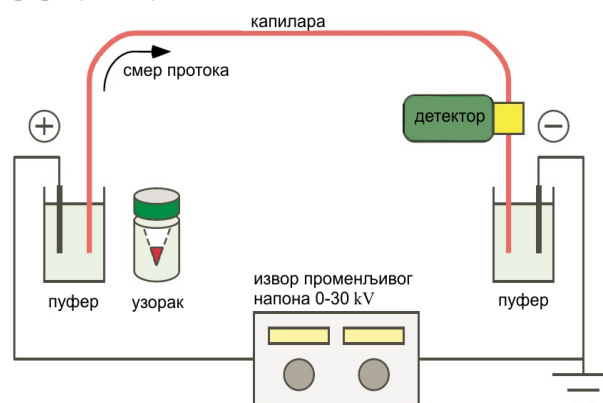
Електрофореза је, у општем смислу, метода раздвајања наелектрисаних супстанци према брзинама кретања у електричном пољу. Прво раздвајање супстанци на бази различитих брзина кретања у електричном пољу изведено је крајем 20-их година XX века. Шведски хемичар Арне Тиселиус (Arne Wilhelm Kaurin Tiselius, 1902–1971.) докторирао је 1930. године са тезом “Техника покретних граница у проучавању електрофорезе протеина”. У годинама које су следиле Тиселиус се бавио истраживањима појава дифузије и адсорпције код природних зеолита, али се од 1936. године враћа развијању технике електрофоретских раздвајања и испитивањима могућности употребе физичких метода за решавање проблема у биохемији. Године 1937. објавио је рад на тему раздвајања серумских протеина знатно усавршеном техником електрофорезе (A. Tiselius, *Trans Faraday Soc* **33** (1937) 524). Са екипом сарадника наставио је да истражује могућности електрофоретских раздвајања и одређивања, за шта је 1948. године добио Нобелову награду за хемију.

Од самог почетка примене електрофорезе па до данас, њене могућности су ограничене појавом загревања медијума услед протока струје. Јачина примењеног електричног поља одређује ефикасност раздвајања, али и промену температуре медијума, па се обично у класичној електрофорези не могу користити електрична поља јача од 100 V/cm. Идејом да се електрофореза изводи у капиларним колонама и конструкцијом првог комерцијалног апарата за “микро” електрофорезу 80-их година XX века, капиларна електрофореза постаје једна од водећих метода на пољу аналитичких раздвајања и одређивања.

### ОСНОВНИ ПРИНЦИПИ

#### 1 Теоријски принципи

Раздвајања капиларном електрофорезом изводе се у капиларама (најчешће *fused silica*) чији је унутрашњи пречник најчешће 25–75  $\mu\text{m}$  (могу бити у опсегу 5–100  $\mu\text{m}$ ) у електричном пољу чија јачина може ићи и до 700 V/cm, уз одговарајући пуфер и начин детекције. Схема уређаја за капиларну електрофорезу дата је на Слици 1.



Слика 1. Схема апаратуре за капиларну електрофорезу

Основни фактори који одређују ефикасност раздвајања су:

1. загревање услед усмереног кретања наелектрисаних честица у електричном пољу (Џулов закон),
2. електроосмоза и
3. дисперзија (ширење) зона раздвајања.

Сви ови фактори директно зависе од особина узорка ( $M_r$ ,  $pK_a$ , структура, образовање комплекса), особина пуфера (pH, вискозност, адитиви, диелектрична константа) и инструмента којим се одређивање изводи (дужина капиларе, јачина примењеног електричног поља).

#### 1. Загревање

Загревање услед усмереног кретања наелектрисаних честица у електричном пољу (Џулов закон) директно је сразмерно квадрату јачине струје, што представља знатан проблем када се електрофореза изводи класичним путем (у кадама, најчешће на по-

лиакриламидном гелу – SDS PAGE). Постојање градијента температуре узрокује постојање градијента густине и појаву конвекције и дифузије због чега долази до ширења пикова и смањења резолуције. Промена температуре током извођења електрофорезе доводи и до промене електрофоретске мобилности супстанци што такође узрокује ширење пикова и смањену репродуцибилност добијених резултата. Промена температуре може довести и до промене особина пуфера и супстанци које се раздвајају.

Велика дужина (и до 100 cm) а мали попречни пресек чине да је отпор у капиларама велики. Према Омовом закону за једносмерну струју, струје

$$\left( I = \frac{U}{R} \right)$$

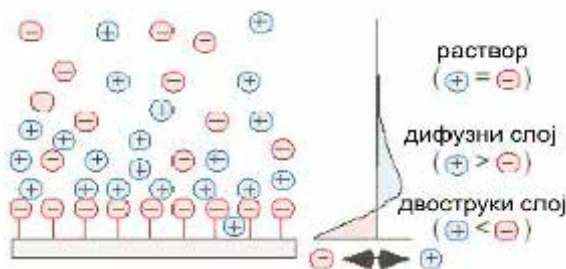
су при електрофорези изведеној у капилари реда величине 10  $\mu\text{A}$  чак и за примењени напон реда величине 30 kV. Према Џуловом закону примењеном на конкретан случај добијамо:

$$T_k - T_o \approx \frac{I^2}{\kappa} \cdot \frac{R_1^2}{2 R_2 h}$$

где су  $T_k$  - температура колоне,  $T_o$  - температура околине,  $I$  - јачина струје,  $\kappa$  - електролитичка проводљивост пуфера,  $R_1$  - унутрашњи пречник капиларе,  $R_2$  - спољашњи пречник капиларе (150–375  $\mu\text{m}$ ),  $h$  - коефицијент преноса топлоте са капиларе на околину.

## 2. Електроосмоза

Површина капилара прекривена је силанолним групама чији степен дисоцијације, а тиме и количина наелектрисања на зиду капиларе, зависе од рН коришћеног пуфера. Киселост силанолних група процењена је рН-метријском титрацијом –  $pK_a$  1.5, па је већ на  $pH > 2$  више од 75 % постојећих група дисоцирано. Зид капиларе је у овим условима негативно наелектрисан и електростатички привлачи позитивно наелектрисане јоне из раствора па долази до образовања двоструког електричног слоја (Слика 2). Позитивно наелектрисани јони се крећу ка катода "носећи" у истом смеру и молекуле растварача. Ово кретање растварача у капилари под утицајем електричног поља назива се електроосмотски проток. Током анализе, ненаелектрисани молекули путују брзином



Слика 2. Схематски приказ расподеле наелектрисања унутар капиларе

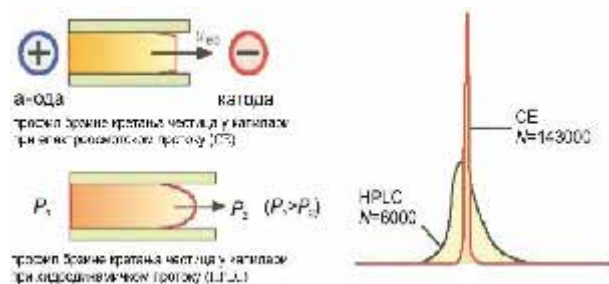
коју одређује брзина електроосмотског протока, и до њиховог раздвајања готово и не долази. Брзина кретања позитивно наелектрисаних јона се повећава, а негативних смањује. Укупна мобилност ( $\mu$ ) супстанци у капилари представља суму електрофоретске ( $\mu_{\text{eof}}$ , зависи од односа  $m/z$ ) и електроосмотске мобилности ( $\mu_{\text{eos}}$ ). Електроосмотска мобилност представљена је изразом:

$$\mu_{\text{eos}} = \frac{\sigma^*}{\kappa \eta} = \frac{\epsilon \Psi_0}{\eta}$$

где су  $\sigma^*$  - густина наелектрисања на површини капиларе,  $\kappa$  - дебљина двоструког електричног слоја,  $\eta$  - вискозност раствора,  $\epsilon$  - диелектрична константа пуфера и  $\Psi_0$  - електрични потенцијал на површини капиларе. Брзина кретања раствора под утицајем електроосмозе на растојању  $x$  од зида капиларе зависи од електроосмотске мобилности и јачине примењеног електричног поља ( $E$ ):

$$v(x) = \mu_{\text{eos}} \cdot E$$

Из израза за брзину и електроосмотску мобилност може се закључити да брзина кретања честица у капилари не зависи од растојања од зида капиларе. Тако је "профил" кретања раствора у капиларној електрофорези "раван" за разлику од закривљеног профила у HPLC-у (Слика 3), па су и пикови знатно ужи (не долази до ширења зона због различитих брзина кретања јона исте врсте у зависности од растојања од зида капиларе), а резолуција већа.



Слика 3. Поређење профила брзине кретања честица и изгледа пикова (иста врста одређивања) у капиларној електрофорези и високо ефикасној течној хроматографији

Предности постојања електроосмотског протока су краће време трајања анализа и могућност детекције и негативно и позитивно наелектрисаних јона на катода, па се практично капиларна електрофореза углавном изводи у "негативном" моду, тј. уношење узорка се изводи у анодном простору, а детектор је постављен у катодном простору (Слика 1). Са друге стране, електроосмотски проток се током серије анализа у истој капилари мења због адсорпције испитиваних супстанци на зиду капиларе (капилара се чешће мора испирати) и понекад га је тешко контролисати, што смањује репродуцибилност одређивања капиларном електрофорезом.

### 3. Дисперзија (ширење) зона раздвајања и резолуција

Дисперзија зона у капиларној електрофорези зависи од дифузије молекула у капилари, од начина уношења и запремине унетог узорка, електроосмотског протока, интеракција супстанци са зидом капиларе и још неколико фактора који слабије утичу на дисперзију.

Ефикасност раздвајања се и овде изражава степеном раздвајања пикова на електроферограму. Израз за резолуцију идентичан је изразу за резолуцију хроматографских раздвајања:

$$R_{es} \equiv \frac{x_2 - x_1}{\frac{1}{2}(w_1 + w_2)}$$

где су  $x_1$  и  $x_2$  положаји центара пикова након раздвајања, а  $w_1$  и  $w_2$  ширине пикова у основи. Иако се принцип раздвајања капиларном електрофорезом не заснива на расподели супстанци између различитих фаза, и овде фигурирају висина ( $H$ ) и број теоријских подова ( $N$ ) као величине од којих зависи ефикасност раздвајања<sup>1</sup>:

$$H = \frac{l}{N}, \quad N = \frac{\mu^2 E^2 t}{2D}$$

где су  $l$  - укупан пређени пут зоне (ефективна дужина капиларе, тј. дужина до детектора),  $D$  - дифузиони коефицијент и  $t$  - миграционо време. Број теоријских подова се једноставно практично одређује мерењем висине ( $h_p$ ) и израчунавањем површине испод пика ( $A_p$ ):

$$N = 2\pi \left( \frac{h_p l}{A_p} \right)$$

## II Практично извођење

Велика предност капиларне електрофорезе је у томе што се иста капилара може користити неограничен број пута, уколико укупна и ефективна дужина одговарају серији анализа. Капилара се за анализе припрема испирањем водом, након чега следи уношење пуфера и подешавање базне линије укључивањем напона који ће бити коришћен за анализе у трајању од неколико минута. Након тога следи уношење узорка. У посебним случајевима, припрема капиларе захтева и додатна испирања (пре уношења пуфера) или уношење гела; на пример у анализама ћелијског садржаја појединачних ћелија капилара се након третирања водом третира и раствором NaOH како би дисоцијација силанолних група била потпуна, а унешена ћелија фиксирана на зиду капиларе.

### 1. Уношење узорка

Већ је поменуто да се у пракси електрофореза у највећем броју случајева изводи у негативном моду, тј. да се узорак уноси у анодном, а детектује у катодном простору. Укупне запремине неопходне за анализу су мале и углавном износе 1–10 nL, што представља још једну од предности капиларне електрофорезе у односу на остале методе одвајања. Узорак се може уносити:

1. хидродинамички
  - а) применом повишеног притиска,
  - б) вакуумом или
  - ц) применом система спојених судова
2. електрокинетички

Хидродинамичко уношење подразумева да се узорак уноси у капилару пре укључивања високог напона.

Применом повишеног притиска унета запремина првенствено зависи од полупречника капиларе и разлике притисака на крајевима капиларе:

$$V = \frac{R_l^4 \Delta P \pi t}{8\eta L}$$

где је  $L$  - укупна дужина капиларе.

Уношење вакуумом подразумева примену сниженог притиска на супротном крају капиларе, тј. на крају у чијој близини се налази детектор.

При уношењу применом повишеног притиска или вакуума, као и при електрокинетичком уношењу, нивои на којима се налазе различити крајеви капилара морају бити једнаки да не би истовремено дошло и до уласка узорка на принципу спојених судова. Ова врста уношења узорка изводи се једноставном променом нивоа на коме се налази крај капиларе уроњен у узорак. Укупна унета запремина дата је изразом:

$$V = 2.84 \cdot 10^5 \left[ \frac{1}{ms} \right] \cdot \frac{\Delta H t R_l^4}{L}$$

где је  $\Delta H$  - висинска разлика између краја капиларе у који се уноси узорак и супротног краја. На пример, ако се крај капиларе унутрашњег пречника  $R_l = 50 \mu m$  и укупне дужине  $L = 50 cm$  издигне за  $\Delta H = 50 mm$  изнад супротног краја капиларе и тако држи  $t = 10 s$ , запремина унетог узорка износиће  $V = 1.78 nL$ .

Електрокинетички се узорак уноси применом импулса високог напона ( $\sim 5 kV$ ) у периоду од неколико секунди ( $t = 5-60 s$ ). Запремина унетог узорка зависи од пречника капиларе, јачине и дужине трајања високонапонског импулса.

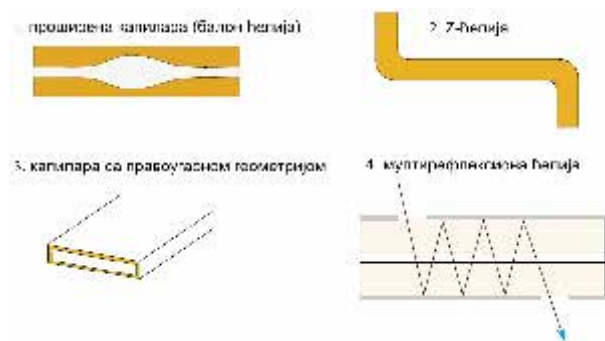
### 2. Детекција

Метода детекције бира се на основу врсте и потребне осетљивости одређивања. Детекција сигнала може се извести на три начина: у капилари (тада разликујемо ефективну  $l$  и укупну дужину капиларе  $L$ ),

<sup>1</sup> Иако нема расподеле јона између различитих фаза, расподела брзина кретања јона једне врсте у капилари има Гаусов изглед, што представља основни разлог за употребу величина попут висине и броја теоријских подова.

на крају или потпуно ван капиларе у микроћелији за прикуљање раствора. Од метода најчешће се користе UV VIS и детекција ласерски индуковане флуоресценције (LIF). У оба случаја детекција се изводи у самој капилари. Како је капилара због ломљивости превучена танким слојем полимера који интензивно апсорбује и у UV и у VIS области, то се пре почетка одређивања на одређеном растојању (ефективна дужина) на капилари направи "прозор" спаљивањем полимерног омотача капиларе. Капилара се затим поставља у носач са "прозором" постављеним тачно наспрам отвора детектора.

Основни проблем UV VIS детекције је осетљивост одређивања због малих унутрашњих пречника капиларе – светлост из извора (D, Хе, Hg или Hg – Хе лампа) се тешко фокусира на капилару, а дужина оптичког пута је мала. Да би се повећала осетљивост треба користити капиларе већег унутрашњег пречника чиме се повећава неопходна запремина узорка за анализу. Просечне вредности границе детекције се крећу у опсегу  $10^{-13}$ – $10^{-15}$  молова [1]. У новије време постоје покушаји превазилажења овог проблема модификацијама капиларе у области детекције (Слика 4).



Слика 4. Различити начини конструкције капилара у области детектора ради повећања осетљивости одређивања

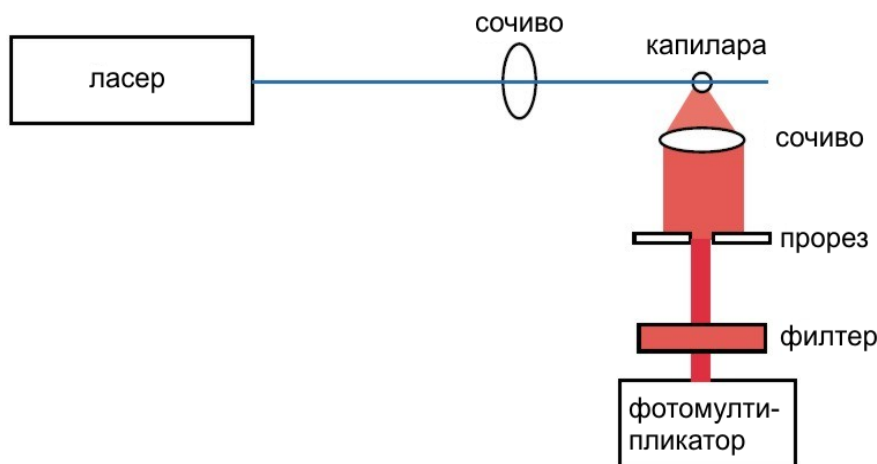
Овај проблем може се превазићи употребом LIF као система детекције (границе детекције се крећу у опсегу  $10^{-15}$ – $10^{-20}$  молова [1].). На Слици 5 дата је схема апаратуре. Ласерски зрак се једноставно фокусира на капиларе, чак и оне пречника  $10 \mu\text{m}$ , а ин-

тензитет зрачења је велики па дужина оптичког пута реда величине десетине  $\mu\text{m}$  не представља проблем за осетљивост одређивања. Међутим, овде постоје проблеми друге врсте: уређаји са LIF детекцијом су скупљи од уређаја са UV VIS детекцијом, а избор таласних дужина знатно је сужен у односу на изворе светлости који се користе за UV VIS детекцију (најчешће се користе  $\text{Ar}^+$  ласер на  $\lambda = 244, 257, 350\text{--}360, 457, 488$  и  $514 \text{ nm}$  и He-Ne ласер на  $\lambda = 543.5$  и  $632.8 \text{ nm}$ ).

У новије време све више се производе апарати са масеним спектрометром као детектором, поготово када се анализирају узорци непознатог састава. Масена спектрометрија (МС) је идеална техника за структурна одређивања када су у питању мале запремине узорака какве се користе у капиларној електрофорези. Основни проблем представља повећање осетљивости капиларе са МС детектором и уклањање електролита, па је неопходно користити методе које ефикасно преводе анализиране супстанце у пару без термалне деградације. За сада се у те сврхе највише користе електроспреј јонизација (EI) и бомбардовање брзим атомима (FAB). Осетљивост одређивања зависи од тога да ли се спектри снимају у комплетном опсегу маса (када је састав узорка познат; осетљивост је мања) или као спектар једноструко наелектрисаних јона (када је састав узорка непознат; већа осетљивост). Обично је граница детекције је  $10^{-12}$ – $10^{-15}$  молова, мада су пријављени и резултати са границом детекције од  $10^{-17}$  молова [1].

Од осталих метода детекције најчешће се користе електрохемијске (потенциометријске, амперометријске и кондуктометријске), радиометријске, рефрактометријске, детекција раманском спектроскопијом итд.

Величине о којима треба водити рачуна у детекцији уопште су однос сигнал/шум (задовољавајући резултати подразумевају да је овај однос  $\geq 2\text{--}3$ ) и осетљивост одређивања најчешће изражена границом детекције. Шум најчешће потиче од мехурова ваздуха (раствори се морају "дегазирати" пре уношења у капилару) или ситних нехомогености унутар капиларе. Због малог унутрашњег пречника капиларе чак ни дестилована нити дејонизована вода немају



Слика 5. Схема апаратуре за капиларну електрофорезу са ласерски индукованом флуоресценцијом

одговарајући степен чистоће, па се користе посебни пречишћавачи са филтрима код којих величина пора не прелази 0.22  $\mu\text{m}$ .

## ТЕХНИКЕ КАПИЛАРНЕ ЕЛЕКТРОФОРЕЗЕ

Када говоримо о практичном извођењу капиларне електрофорезе разликујемо неколико модова (техника):

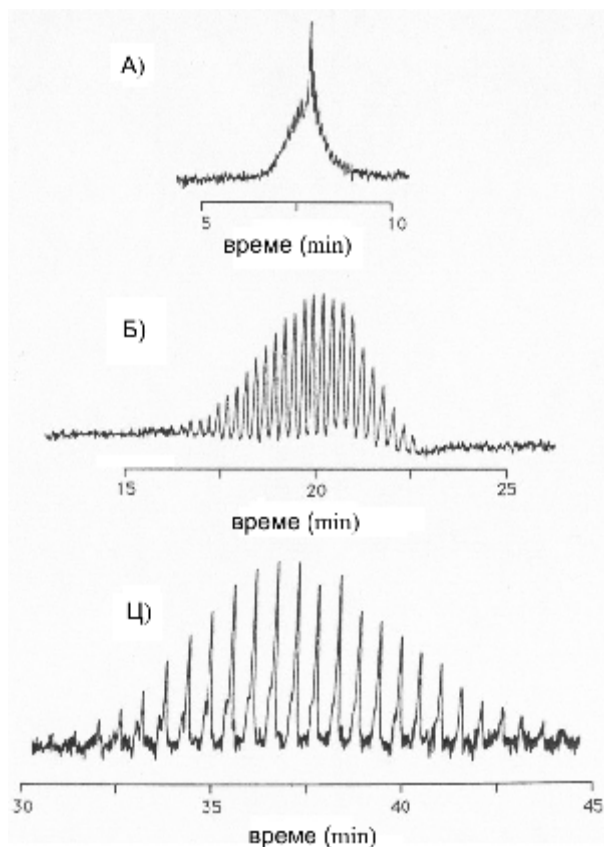
1. капиларна зонска електрофореза (CZE<sup>1</sup>),
2. капиларна гел електрофореза (CGE),
3. мицеларна електрокинетичка хроматографија (МЕКС),
4. капиларно изоелектрично фокусирање (CIEF)
5. капиларна изотакофореза (CITP).

1. Под капиларном зонском електрофорезом подразумева се, уствари, класична капиларна електрофореза у којој је раздвајање одређено брзинама кретања јона у електричном пољу у складу са односом  $m/z$ , у смеру од аноде ка катоде. Укупна брзина кретања, као што је раније речено, представља векторски збир брзина електроосмотског (зависи највише од особина растварача – пуфера) и електрофоретског кретања (највише зависи од особина самог узорка).

2. Капиларна гел електрофореза представља технику у којој је капилара напуњена гелом, па раздвајање зависи не само од односа  $m/z$ , него и од величине јона. Као гел се углавном користе полиетилен оксид (PEO), полиакрил амид (РАА), декстран или агароза. Повећавањем концентрације гела повећава се резолуција раздвајања, али и продужава време трајања анализе (пример је дат на Слици 6).

CGE има две битне предности у односу на CZE: присуством гела у капилари неутралисан је електроосмотски проток, па су одређивања знатно репродуктивнија и капиларном гел електрофорезом се могу раздвајати и полимерни молекули као што су ДНК и протеини код којих се променом броја мономера однос  $m/z$  не мења знатно, али се величина мења.

3. Мицеларна електрокинетичка хроматографија је техника у којој се супстанце раздвајају на основу различите расподеле између две фазе, па одатле и назив хроматографија у имену. У овом случају у колону се убацује нека површински активна супстанца у концентрацији довољној да би дошло до удруживања молекула и образовања мицела. Како је унутрашњост мицела хидрофобна, овом техником се осим јона могу раздвајати и ненаелектрисане честице. Мицеле у капилари практично представљају матрикс кроз који путују и јони и ненаелектрисане честице. Јони се не расподељују између раствора и унутрашњости честица те њихово раздвајање и даље зависи само од брзине кретања, која је, додуше, измењена електростатичким интеракцијама са наелектрисаном површином мицела. Ненаелектрисане честице се раздвајају искључиво у складу са расподелом између раствора и унутрашњости мицела, а она



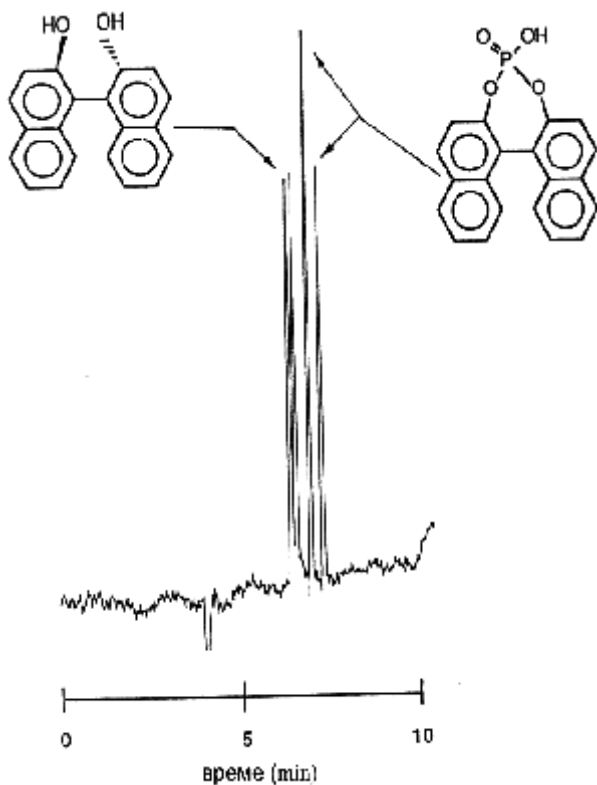
Слика 6. CGE електроферограми стандардног раствора олигонуклеотида  $p(dA)_{12-18}$ . А) 6 % PEO, Б) 8 % PEO, Ц) 10 % PEO; Услови одређивања: капилара  $R_f$  75  $\mu\text{m}$ ,  $l$  30 cm;  $E$  250 V/cm;  $\lambda$  260 nm; 75 mM Трис-боратни пуфер pH 8.3

зависи од хидрофобности молекула. Као површински активне супстанце углавном се користе: натријум додецил сулфат (SDS, анијонски сурфактант), цетилтриметиламонијум хлорид (катијонски сурфактант), CHAPS (циктерјонски сурфактант) или Triton X-100 као неутрални сурфактант. Пример раздвајања оптичких изомера неких бинафтила дат је на Слици 7.

4. Капиларно изоелектрично фокусирање је техника за раздвајање и концентровање протеина према вредностима њихових изоелектричних тачака ( $pI$  вредност представља  $pH$  вредност на којој је број позитивних и негативних наелектрисања протеина једнак, па је протеин електронеутралан). У капилари се формира градијент  $pH$  и то тако да вредности  $pH$  расту идући од аноде ка катоде (Слика 8). Како су протеини "zwitter" јони чије наелектрисање зависи од  $pH$  вредности (на  $pH > pI$  протеини су негативно наелектрисани и обратно), то ће се, по укључивању високог напона, сваки од њих кретати ка тачки у којој постаје електронеутралан, и ту се зауставити. Да би се формирао градијент  $pH$  у капилару се, заједно са смесом протеина, уноси и смеша амфолита (такође

<sup>1</sup> Уобичајено је да се и код нас користе скраћенице енглеских имена.



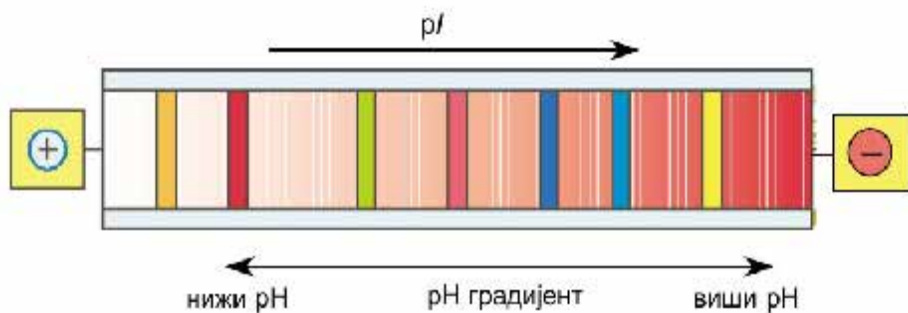


Слика 7. МЕКС електроферограм раздвајања енантиомера неких бинафтила уз натријум деоксихолат (NaDC) као сурфактант; Услови одређивања: капилара  $R_f$  50  $\mu\text{m}$ ,  $l$  65 cm;  $E$  300 V/cm; мобилна фаза 0.01 M NaDC, 0.01 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.006 M  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$

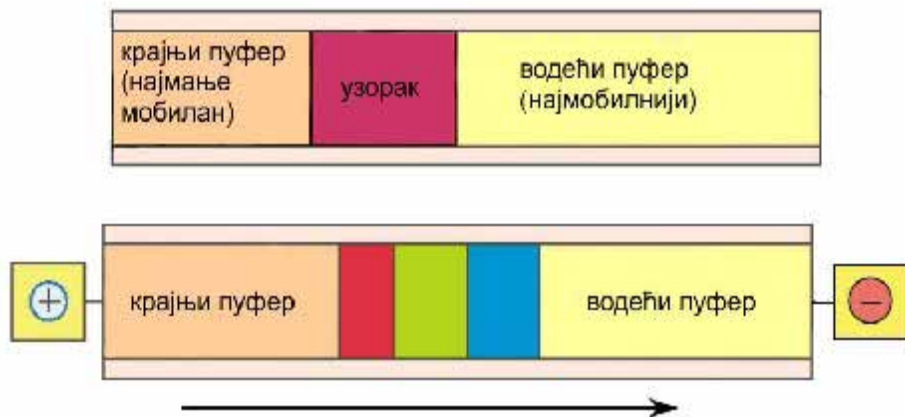
"zwitter" јони) направљена тако да покрива широку област рН вредности. По укључивању електричног поља образује се рН градијент, а протеини фокусирају у зонама где је  $pI = pH$ . Зоне у којима се налазе протеини су врло уске (ефикасно фокусирање), јер ако и дође до дифузије протеина изван зоне, он поново постаје наелектрисан и креће се назад у зону. Када је фокусирање завршено, кроз капилару више не протиче струја, а како због ефикаснијег фокусирања електроосмотски проток мора бити елиминисан претходним третирањима капиларе, протеини остају непокретни. Мобилизација се изводи применом повишеног притиска на крају супротном од краја где се налази детектор, или додавањем соли у катодни или анодни резервоар.

Запремине које се користе у CIEF су знатно веће него у претходно описане три технике, јер је у овом случају комплетна капилара испуњена узорком. Проблеми могу настати ако су концентрације протеина велике толико да долази до њиховог таложења што доводи до зачепљења капиларе.

5. У капиларној изотакофорези узорак је у "сендвичу" између два пуфера чије се мобилности у електричном пољу знатно разликују (Слика 9). Пуфери се бирају тако да су јонске покретљивости супстанци у узорку по вредностима између покретљивости коришћених пуфера. У капилару се прво уноси пуфер највеће покретљивости – "водећи" пуфер, па смеша супстанци за раздвајање и на крају пуфер најмање покретљивости. Укључивањем електричног поља долази до прерасподеле компоненти узорка према покретљивостима, али се оне даље крећу искључиво ношене пуферима, па је брзина кретања



Слика 8. Схематски приказ принципа раздвајања техником капиларног изоелектричног фокусирања



Слика 9. Схематски приказ принципа раздвајања техником капиларне изотакофорезе

свих зона кроз капилару једнака (специфичност СИТР). И у овој техници, као и код СИЕФ долази до фокусирања, па се она може користити за преконцентравање узорака. Мана ове технике је да се анјони и катјони не могу истовремено анализирати.

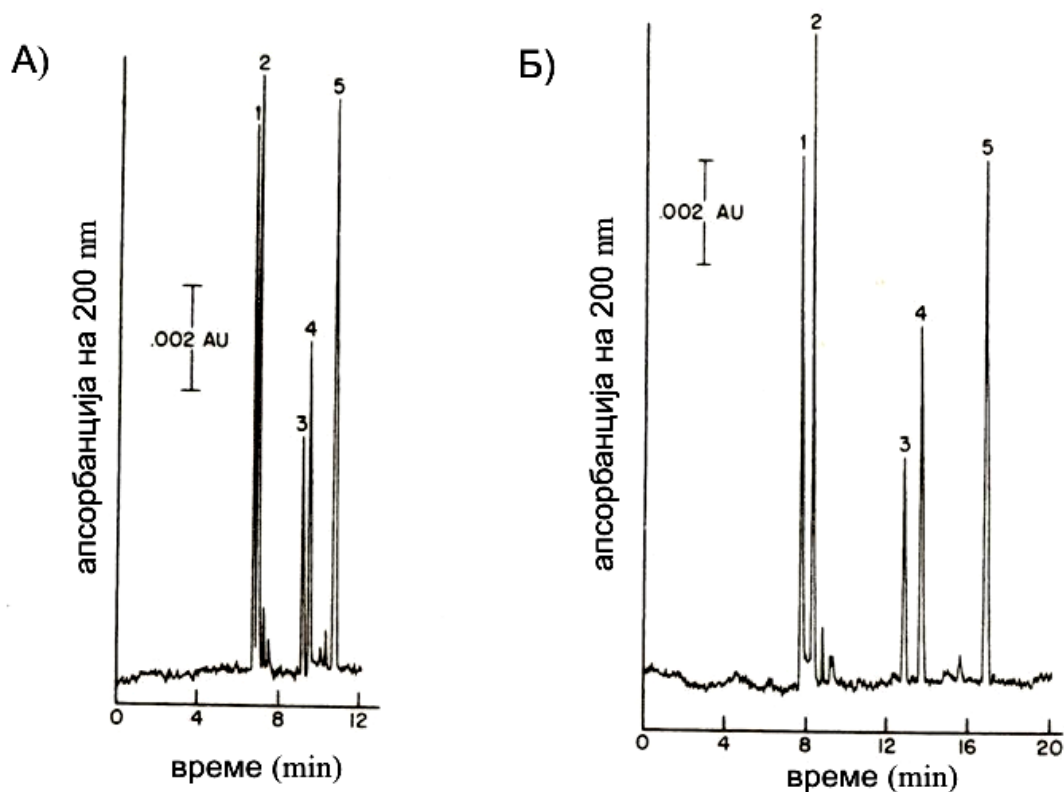
## ПРИМЕНА

Последњих 10 година капиларна електрофореза заузима важно место у одређивању секвенце ДНК [2] и одређивању мутација на ДНК [3]. Једноставност препознавања нуклеотидних база системом LIF чини је методом избора када је секвенцирање у питању, мада се у новије време у ове сврхе све више користе *in situ* хибридизација и масена спектрометрија.

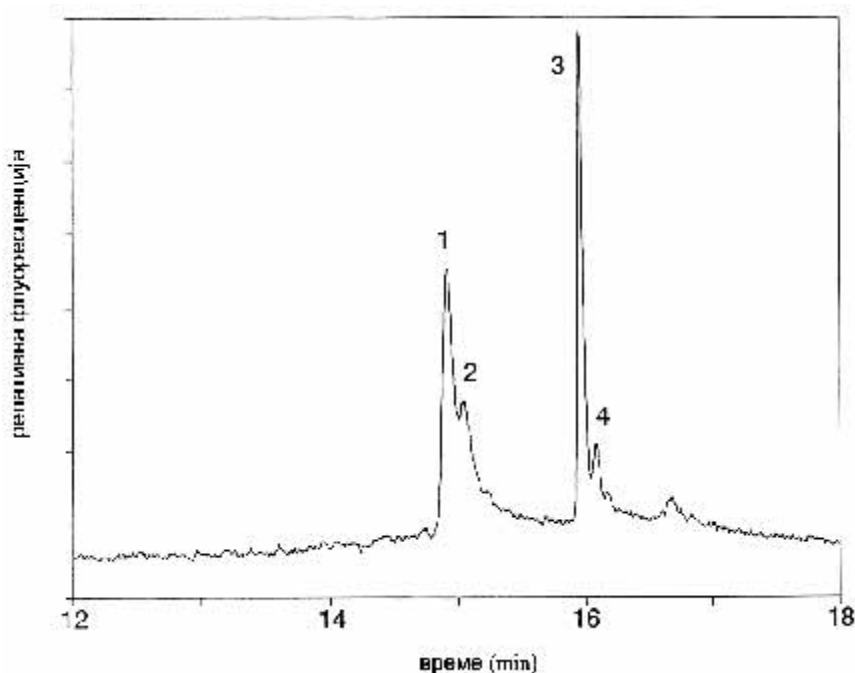
Када је секвенцирање у питању, PCR методом (Polimerase Chain Reaction), се на основу темплата ДНК синтетише нови молекул у коме су у новосинтетисаном ланцу све базе обележене различитим флуоресцентним бојама. Овако обележен молекул интензивно апсорбује па су границе детекције врло ниске (и до  $10^{-16}$  mol/L). Секвенцирање се изводи капиларном гел електрофорезом уз четири фотомултипликатора као детектора (сваки са филтером за одређену боју). Електроферограми са различитих детектора се на крају преклапају и тако одређује комплетна секвенца анализираних ДНК. У новије време се за секвенцирање, као и за проналажење мутација на ДНК, користе системи од 96 капилара, што

знатно скраћује време анализе када је у питању велики број узорака (клиничка одређивања). Овакво секвенцирање се изводи на ручно склопљеним апаратима, јер комерцијални немају могућност истовременог коришћења 96 капилара и 4 детектора. Међутим због једноставности апаратуре за СЕ са LIF детекцијом (Слика 5) ово не представља проблем. Основни проблем оваквог начина секвенцирања ДНК су цена и токсичност флуоресцентних обележивача.

Капиларна електрофореза нуди бројне могућности за анализе протеина: одређивање молекулске масе, одређивање *pI* вредности, раздвајање, пречишћавање и, под одређеним условима проучавање динамике протеина. Највише могућности пружа СЕ са LIF детекцијом због високе осетљивости и чињенице да протеине, због сопствене флуоресценције, углавном није потребно обележавати. Међутим, како су апарати (комерцијални или ручно склопљени) са LIF детекцијом знатно скупљи, UV детекција се чешће користи. Проблеми у анализама протеина потичу од високог степена електростатичких интеракција протеина са зидовима капилара, па се, зависно од *pI* вредности протеина смесе, капиларе углавном третирају одговарајућим сурфактантима како би интеракције биле минималне, а репродуктивност задовољавајућа. Пример одређивања дат је на Слици 10.



Слика 10. СЗЕ електроферограми протеина; пикови: 1. лизозим, 2. цитохром ц, 3. рибонуклеаза А, 4.  $\alpha$ -химо-трипсиноген и 5. миоглобин. Услови одређивања: А) капилара третирана Tween-ом 20, Б) капилара третирана BRIJ-ом 35;  $R_f$  75  $\mu$ m,  $l$  50 cm;  $E$  300 V/cm; 10 mM фосфатни пуфер pH 7;  $\lambda$  200 nm



**Слика 11.** CZE електроферограм ћелије еритроцита одраслог дијабетичара; пикови: 1.  $\beta$  ланац, 2.  $\beta$ -глицинован ланац, 3.  $\alpha$  ланац и 4.  $\alpha$ -глицинован ланац. Услови одређивања: капилара  $R_1$  20  $\mu\text{m}$ ,  $R_2$  360  $\mu\text{m}$ ,  $l$  65 cm;  $E$  330 V/cm

У проучавању ћелијског састава капиларна електрофореза има значајно место. Захваљујући изузетно ниским границама детекције и фокусираности ласерског снопа, LIF системи се користе и за анализе појединачних ћелија [4]. Ћелије се гаје у култури и затим применом сниженог притиска (шприци или пумпица на супротном крају капиларе) са микроскопских плочица увлаче у капилару. Цео процес посматрамо микроскопом. Капиларе које се користе за овакве анализе су изузетно малих унутрашњих пречника, 10–20  $\mu\text{m}$  (пречници ћелија су реда величине  $\mu\text{m}$ ), и морају претходно бити третиране (углавном раствором NaOH) како би дошло до фиксирања ћелије на зид капиларе. Након што је ћелија фиксирана, лизирање се најчешће изводи применом импулса високог напона или раствором SDS-а. Осим ћелијских протеина и нуклеинских киселина на овај начин се могу анализирати и фосфолипиди, полисахариди и јони који се налазе унутар ћелија, као и динамика ћелијских органела. Пример је дат на Сlici 11.

Капиларна електрофореза се данас рутински користи у многим областима: хемији и биохемији, медицини, молекуларној биологији, заштити животне средине, итд., али су истраживања нових могућности примене још увек бројна.

Abstract

CAPILLARY ELECTROPHORESIS: BASIC PRINCIPLES AND APPLICATION

Tatjana Verbić

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Electrophoresis is a process in which charged species (ions or colloidal particles) are separated based upon diffe-

rential migration rates in an electrical field. The first sophisticated electrophoretic apparatus was developed by Swedish scientist Arne Tiselius (Nobel Prize for chemistry in 1948). In the subsequent years electrophoretic separations were the backbone of much research by biochemists and molecular biologists. But as classical electrophoresis is slow, labor intensive technique with poor reproducibility, a new technique – capillary electrophoresis was developed in the mid 1980s. Electrophoretic separation is done in capillaries that are usually 25–75  $\mu\text{m}$  wide (small sample volumes are used (1–10 nL)), under electric field which strength can rise up to 700 V/cm without significant system heating.

Therefore capillary electrophoresis (CE) is recognized as a powerful analytical separation technique that brings speed, quantitation, reproducibility, and automation to the inherently highly resolving but labor intensive methods of electrophoresis. CE has established itself as an important and widely utilized technique for routine analytical separations, isolation, and analysis of proteins, polynucleotides, and other biopolymers.

## ЛИТЕРАТУРА

1. P. D. Grossman, J. C. Colburn, Capillary Electrophoresis, Theory and Practice, Academic Press Inc, San Diego, 1992
2. V. Dolnik, J. Biochem. Biophys. Methods, 41 (1999) 103
3. Q. Gao, E. S. Yeung, Anal. Chem. 72 (2000) 2499
4. E. S. Yeung, J. Chromatogr. A, 830 (1999) 243
5. D. A. Skoog, J. J. Leary, Principles of Instrumental Analysis, Saunders College Publishing, Orlando, 1992
6. S. Il Cho, Short Course on CE, <http://bachem.snu.ac.kr/~sicho>